

(6)

MEASUREMENT OF HDL-CHOLESTEROL IN SERUM OR PLASMA

Patent number: JP8116996
Publication date: 1996-05-14
Inventor: MAJIMA HATSUICHI; ASANO SHIGEKI; KIKUCHI TOSHIRO; KAWAMURA YOSHIHISA
Applicant: TOYO BOSEKI
Classification:
- international: C12Q1/60; C12Q1/26; C12Q1/28; C12Q1/44
- european:
Application number: JP19940262679 19941026
Priority number(s): JP19940262679 19941026

[Report a data error here](#)

Abstract of JP8116996

PURPOSE: To provide a method for simply and accurately measuring HDL- cholesterol in serum and plasma. **CONSTITUTION:** This method for measuring HDL-cholesterol in serum or plasma comprises treating a sample obtained from a serum or a plasma with a solution containing a lipoprotein fractionating agent, then, retaining the resultant mixed solution together with a reagent containing an anionic surfactant, a cholesterol esterase and a cholesterol oxidase at a constant temperature without carrying out separation treatment of solid and liquid and measuring the produced hydrogen peroxide. Furthermore, a reagent for measuring the HDL-cholesterol is provided. The reagent for measuring the cholesterol effectively acts on HDL- cholesterol by adding the anion surfactant thereto.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-116996

(43)公開日 平成8年(1996)5月14日

6

(51)Int.C1.⁶

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 Q 1/60

6807-4 B

1/26

6807-4 B

1/28

6807-4 B

1/44

6807-4 B

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L

(全 8 頁)

(21)出願番号

特願平6-262679

(22)出願日

平成6年(1994)10月26日

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72)発明者 馬島 肇一

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 浅野 茂樹

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 菊地 俊郎

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定する方法

(57)【要約】

【目的】 血清や血漿中のHDL-コレステロールを簡便かつ正確に測定する方法を提供する。

【構成】 血清または血漿から得た試料をリポ蛋白分画剤を含む溶液で処理し、次いで得られた混合液を固体及び液体の分離処理をすることなく、アニオン界面活性剤、コレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを含む試薬とともに恒温保持し、生成した過酸化水素を測定する血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定する方法およびそのための試薬。

【効果】 アニオン界面活性剤を含有させることにより、コレステロール測定試薬が、HDL-コレステロールに効果的に働く。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 血清または血漿から得た試料をリポ蛋白分画剤を含む溶液で処理し、次いで得られた混合液を固体及び液体の分離処理をすることなく、アニオン界面活性剤の存在下に、コレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼと反応させ、生成した過酸化水素を測定することを特徴とする血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定する方法。

【請求項2】 アニオン界面活性剤がアルキルスルホン酸塩または胆汁酸あるいはその誘導体であることを特徴とする請求項1記載の血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定する方法。

【請求項3】 コレステロールオキシダーゼが、グルコースの重合度10以下の直鎖オリゴ糖または環状オリゴ糖またそれらの誘導体で化学修飾したコレステロールオキシダーゼであることを特徴とする請求項1記載の血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定する方法。

【請求項4】 コレステロールエステラーゼが、グルコースの重合度10以下の直鎖オリゴ糖または環状オリゴ糖またはそれらの誘導体で化学修飾したコレステロールエステラーゼであることを特徴とする請求項1記載の血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定する方法。

【請求項5】 リポ蛋白分画剤が、デキストラン硫酸、ヘパリン、リンタングステン酸ナトリウムおよびアミロベクチン硫酸よりなる群から選ばれる1種または2種以上のポリアニオンおよびマグネシウム、カルシウム、マンガン、コバルトおよびニッケルよりなる群から選ばれる1種または2種以上の2価陽イオンの組み合わせであることを特徴とする請求項1記載の血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定する方法。

【請求項6】 血清または血漿から得た試料をデキストラン硫酸、ヘパリン、リンタングステン酸ナトリウムおよびアミロベクチン硫酸よりなる群から選ばれる1種または2種以上のポリアニオンおよびマグネシウム、カルシウム、マンガン、コバルトおよびニッケルよりなる群から選ばれる1種または2種以上の2価陽イオンの組み合わせであるリポ蛋白分画剤を含む溶液で処理し、次いで得られた混合液を固体及び液体の分離処理をすることなく、アルキルスルホン酸塩または胆汁酸あるいはその誘導体であるアニオン界面活性剤、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、4-アミノアンチビリン、色原体および緩衝液を含む試薬と反応させ、生成した過酸化水素を測定することを特徴とする血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定する方法。

【請求項7】 リポ蛋白分画剤、コレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼ、アニオン界面活性剤、緩衝液および必要によりペルオキシダーゼ、4-アミノアンチビリンおよび色原体を含むことを特徴とする血清または血漿中のHDL-コレステロール測定法およびその試薬に関する。

4-アミノアンチビリンおよび色原体を含むことを特徴とする血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定するための試薬。

【請求項8】 第1試薬がリポ蛋白分画剤、緩衝液、コレステロールエステラーゼ、ペルオキシダーゼおよびアニオン界面活性剤を含み、第2試薬がリポ蛋白分画剤、緩衝液、コレステロールオキシダーゼおよびアニオン界面活性剤を含むことを特徴とする請求項7記載の血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定するための試薬。

【請求項9】 アニオン界面活性剤がアルキルスルホン酸塩または胆汁酸あるいはその誘導体であることを特徴とする請求項7記載の血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定するための試薬。

【請求項10】 コレステロールオキシダーゼが、グルコースの重合度10以下の直鎖オリゴ糖または環状オリゴ糖またそれらの誘導体で化学修飾したコレステロールオキシダーゼであることを特徴とする請求項7記載の血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定するための試薬。

【請求項11】 コレステロールエステラーゼが、グルコースの重合度10以下の直鎖オリゴ糖または環状オリゴ糖またはそれらの誘導体で化学修飾したコレステロールエステラーゼであることを特徴とする請求項7記載の血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定するための試薬。

【請求項12】 リポ蛋白分画剤が、デキストラン硫酸、ヘパリン、リンタングステン酸ナトリウムおよびアミロベクチン硫酸よりなる群から選ばれる1種または2種以上のポリアニオンおよびマグネシウム、カルシウム、マンガン、コバルトおよびニッケルよりなる群から選ばれる1種または2種以上の2価陽イオンの組み合わせであることを特徴とする請求項7記載の血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定するための試薬。

【請求項13】 デキストラン硫酸、ヘパリン、リンタングステン酸ナトリウムおよびアミロベクチン硫酸よりなる群から選ばれる1種または2種以上のポリアニオンおよびマグネシウム、カルシウム、マンガン、コバルトおよびニッケルよりなる群から選ばれる1種または2種以上の2価陽イオンの組み合わせであるリポ蛋白分画剤、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、アルキルスルホン酸塩または胆汁酸あるいはその誘導体であるアニオン界面活性剤、緩衝液および必要によりペルオキシダーゼ、4-アミノアンチビリンおよび色原体を含むことを特徴とする血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定するための試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、血清または血漿中のHDL-コレステロール測定法およびその試薬に関する。

血清や血漿に含有されるHDL-コレステロールは、冠状動脈硬化症における危険予防因子として注目されており、その測定が臨床上有用になってきている。

【0002】

【従来の技術】脂質はエネルギー源として、また生体膜や血漿リポ蛋白などの構成成分として生体内で重要な役割を果たす。脂質は主にコレステロール、リン脂質、トリグリセライド（中性脂肪）、遊離脂肪酸からなる。体内で脂質は運搬体としてアボ蛋白と結合してリポ蛋白となり転送される。リポ蛋白にはカイロマイクロン、超低比重リポ蛋白（HDL）、低比重リポ蛋白（LDL）、高比重リポ蛋白（HDL）などがあり、それぞれが役目を持って脂質の転送に働いている。コレステロールの運搬体としては、中でもLDLとHDLが注目されている。LDLは血中コレステロールの主たる運搬体であり、これはLDL経由によって動脈壁細胞を含む諸臓器の実質細胞に取り込まれ、同時に細胞内のコレステロール生合成を抑制する。また、この取り込みに関与するLDL受容体数の増減によって細胞内へのコレステロールの過剰蓄積を防いでおり、受容体機構の障害などによる高コレステロール血症は動脈効果の促進因子とされている。HDLは動脈壁を含めた各組織からコレステロールを受け取り、LCATの作用でエステル化して内部に取り込み、肝臓へ輸送して異化させる機能をもち、細胞内に蓄積したコレステロールの除去作用に関係し、またHDLの一部はLDL受容体と競合的に結合してLDLの取り込みを抑制している。これらのリポ蛋白の代謝に異常をきたすと、脳梗塞、動脈硬化、虚血性の心臓病などが起こる。

【0003】HDL-コレステロールは、これらのリポ蛋白中の1成分であり、その測定のためには、リポ蛋白の分画とコレステロールの定量の2段階に分けて考える必要があった。HDL-コレステロールの測定法としては、従来、超遠心分離法・電気泳動法・沈澱法などがあげられるが、これらはいずれも超遠心分離・電気泳動・分画剤による沈澱生成などの手段により予めリポ蛋白を分画してHDL画分を分離したのちに、公知の総コレステロール測定法によりコレステロールを測定する方法である。

【0004】超遠心分離法は、超遠心分離により比重1.063～1.210の間に分画されるHDLを分取し、そのコレステロールを測定する方法であるが、高価な超遠心分離機を必要とし、操作が煩雑で定量性に問題がある。

【0005】電気泳動法は、セルロースアセテート膜やアガロースゲルなどを支持体として電気泳動を行い、リポ蛋白を分離した後、酵素法によりコレステロールを発色させ、デンシトメトリーで百分率を算出し、総コレステロール値を掛けて各画分を定量する方法であり、HDLは α 1-グロブリンの位置に泳動される。しかしこの方

法も操作が煩雑で時間を要するという問題がある。

【0006】沈澱法は、マグネシウム・カルシウム・マンガンなどの2価陽イオンと、デキストラン硫酸・ヘパリンなどのポリアニオンを組み合わせて、HDL以外のリポ蛋白を沈澱させ、上清のHDL-コレステロールを測定する方法であるが、前処理として遠心分離操作を行う必要があり、自動分析機には直接適用できず操作が煩雑で時間を要する。

【0007】遠心分離操作を必要としない沈澱法もいくつか開発されている。たとえば、特開平6-102276号公報には、公知の沈澱剤と寒天粉末・ケイソウ土・酸化アルミニウム粉末などの沈澱助剤からなる分離剤による分画の後、コレステロールを測定する方法が開示されている。この方法は検体と分離剤を混合する操作が必要であり、多数の検体を測定するには適していない方法である。

【0008】また、日本臨床検査自動化学会会誌19巻4号(1994) 634頁には、デキストラン硫酸と塩化マグネシウムの結合した磁性体粒子を分離剤として用い、磁石によってHDL分画以外のリポ蛋白分画を沈澱させた後、コレステロールを測定する方法が開示されている。しかし、この方法も検体と分離剤を混合する操作が必要であり、多数の検体を測定するには適していない方法である。

【0009】そこで近年になって、分離剤の使用や遠心分離操作を必要とせず、検体を直接自動分析機に適用することが可能なHDL-コレステロール測定法がいくつか開発された。たとえば特開昭63-126498号公報には、特定の試薬組成・測定条件のもとではコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼの反応は2相で経過する、すなわち、ある条件下ではLDL-コレステロールが先に反応し、HDL-コレステロールとの反応が時間的に遅れて開始することを利用する方法が開示されている。この方法では、LDL-コレステロールが十分反応した時点以降の時間域での吸光度変化をとることによりHDL-コレステロールを測定する。しかしこの方法は、沈澱法（実施例ではリンタングステン法）に対する相関係数の傾きが条件によって一定せず、相関係数も0.679～0.973と良好でない。さらに、この方法は酵素や界面活性剤などの試薬組成や温度や測定時間域など測定条件の微妙なバランスの上に成り立つ方法であるため、試薬の安定性や測定条件のばらつきの影響を受けやすいと考えられる。

【0010】また、特公平6-16720号公報には、胆汁酸などのある種の界面活性剤の存在下では、HDL以外のコレステロールのみがコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼとの反応に関与することを利用した方法が開示されている。この方法は、第1反応で胆汁酸等の存在下でHDL以外に含まれるコレステロールを反応させ、ついで第2反応で非イオン系ポ

リエチレンオキシド基含有界面活性剤または第2アルカシンスルホネートを添加して、残りのHDLコレステロールとの反応を行うものである。しかし、この方法は沈澱法に対する相関係数の傾きが1でなく、相関係数も0.814と良好でない。

【0011】さらに、日本臨床検査自動化学会会誌19巻4号(1994)629,630頁には、ポリエチレングリコールおよび抗アポB抗体、抗アポCIII抗体により、HDL以外のリボ蛋白を凝集させ、この時、凝集しないHDLに酵素法によるコレステロール測定試薬を作用させ、発色させた後、グアニジンにより反応を停止させ、かつ凝集を透明化させて比色定量する方法が開示されている。しかし、この方法は4段階の反応を必要とするため、現在普及している大部分の自動分析機には適用できない。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記に示した操作の煩雑さや測定の正確性に関与する問題点を解消しようとするものであり、その目的とするところは、血清や血漿中のHDL-コレステロールを簡便かつ正確に測定する方法を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するために、鋭意検討したところ、血清または血漿から得た試料をリボ蛋白分画剤を含む液で処理し、ついで、得られた混合液を固体及び液体の分離処理をすることなく、コレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを含む系とともに恒温保持し、生成した過酸化水素を測定することにより、前処理なしで直接自動分析機に適用でき、かつ正確性の高い、HDL-コレステロール測定法の発明に至った。

【0014】すなわち本発明は、血清または血漿から得た試料をリボ蛋白分画剤を含む溶液で処理し、次いで得られた混合液を固体及び液体の分離処理をすることなく、アニオン界面活性剤の存在下にコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを作用させ、生成した過酸化水素を測定することを特徴とする血清または血漿中のHDL-コレステロールを測定する方法である。

【0015】本発明に使用するリボ蛋白分画剤の種類は、特に限定されない。たとえば公知のものとしてデキストララン硫酸・ヘパリン・リンタングステン酸ナトリウム・アミロペクチン硫酸などのポリアニオンと、マグネシウム・カルシウム・マンガン・コバルト・ニッケルなどの2価陽イオンの組み合せが挙げられる。本発明に使用するリボ蛋白分画剤を含む溶液としては、上記リボ蛋白分画剤の他に、ポリエチレングリコールなどがある。

【0016】本発明では、コレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを作用させて、過酸化水素を生成させる。これらの酵素を含む試薬は、アニ

オン界面活性剤および緩衝液を含む。コレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを含むコレステロール検出試薬は、アニオン系界面活性剤を含有させることにより、リボ蛋白分画剤で処理された混合液中のHDL-コレステロールに有効に働く。

【0017】本発明に使用するアニオン界面活性剤の種類は、特に限定されないが、1-ペンタンスルホン酸塩、1-ヘキサンスルホン酸塩、1-ヘプタンスルホン酸塩、1-オクタンスルホン酸塩などのアルキルスルホン酸塩や、コレ酸塩やデヒドロコレ酸塩などの胆汁酸またはその誘導体が好適である。上記のうちでは特に、1-ヘキサンスルホン酸塩、1-ヘプタンスルホン酸塩が好適である。なお、非イオン界面活性剤だけの使用は、HDL-コレステロールのみならずLDL-コレステロールをも反応させてしまうので、本発明にとっては好ましくない。

【0018】本発明に使用するコレステロールオキシダーゼは化学修飾していない酵素、化学修飾した酵素などがあり、その起源は、特に限定されない。たとえばストレプトマイセス(*Streptomyces*)属の属する細菌由来の酵素が利用できる。また、化学修飾した酵素の例としては、グルコースの重合度が10以下の直鎖オリゴ糖または環状オリゴ糖またはそれらの誘導体で化学修飾したコレステロールオキシダーゼなどがある。

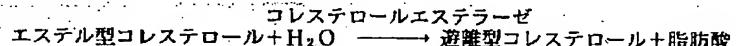
【0019】本発明に使用するコレステロールエステラーゼは化学修飾していない酵素、化学修飾した酵素などがあり、その起源は、特に限定されない。たとえばシードモナス(*Pseudomonas*)属やシソフィラム(*Schizophyllum*)属に属する細菌などが利用できる。また、化学修飾した酵素の例としては、グルコースの重合度が10以下の直鎖オリゴ糖または環状オリゴ糖またはそれらの誘導体で化学修飾したコレステロールエステラーゼなどがある。これらの中では、シードモナス(*Pseudomonas*)属に属する細菌由来のコレステロールエステラーゼをオリゴ糖または環状オリゴ糖またはその誘導体で化学修飾したもののが好適である。

【0020】化学修飾酵素は、オリゴ糖の糖鎖にスペーサーを結合させた蛋白質修飾剤と酵素を結合させて得ることができる。蛋白質修飾剤はオリゴ糖の水酸基もしくは還元末端のアルデヒド基に各種スペーサーを導入し、オリゴ糖を活性化することにより得られる。結合させるオリゴ糖鎖としては、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオースなどのオリゴ糖鎖が挙げられる。スペーサーとしては、トリアジン環を有するもの、例えば塩化シアヌル、フッ化シアヌルなどが挙げられる。またスペーサーを結合させる方法としては、塩化シアヌル等のトリアジン環を有する化合物をアセトン、DMF等の水可溶性有機溶媒に溶解し、これとオリゴ糖を水溶液中で反応させ、トリアジン誘導体に導き、活性化し酵素表面のアミノ基を修飾する

方法などがある。蛋白質修飾剤と酵素との反応は、例えば炭酸緩衝液中でpH 8~10、好ましくはpH 8.5~9.5のもとに、0~40°Cの温度にて約2~48時間で行なうことにより酵素へ修飾剤を導入することができる。

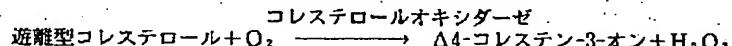
【002.1】コレステロール検出試薬は、さらに必要により過酸化水素検出試薬、例えばペルオキシダーゼ、4-アミノアンチビリン、色原体および緩衝液を含む。過酸化水素を発色定量する試薬である4-アミノアンチビリン、色原体および緩衝液は、通常使用されるものを使用する。4-アミノアンチビリンに代えて、水系受容体としては、3-メチル-2-ベンゾチアゾリン誘導体などを使用してもよい。ペルオキシダーゼとしては、植物由来のもの、微生物由来のものなどがあり、例えば西洋ワサビ (Horse radish) 由来のものが挙げられる。色原体としては、フェノール誘導体、例えばp-キシレノール、p-クロロフェノール、2, 5-ジクロロフェノール、スルホン酸、3-ヒドロキシ-2, 4, 6-トリヨード安息香酸などがある。アニリン誘導体、例えばN-エチル-N-(3-スルホプロピル)-m-アニジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジンなどがある。緩衝液としては、ビペラジン-N, N'-ビス(2-エタンスルホン酸)、N-2-ヒドロキシエチルビペラジン-N'-2-エタンスルホン酸、N-(2-アセトアミド)イミノジ酢酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸などのいわゆるグッド緩衝液やリン酸緩衝液などがある。

【002.2】本発明のHDL-コレステロールを測定するための試薬は、リポ蛋白分画剤、緩衝液、アニオン界面活性剤、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼおよび過酸化水素検出試薬を含む。該試*

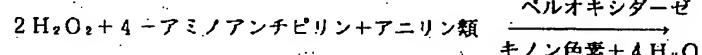


【002.7】

※※【化2】



【002.8】さらに、生成した過酸化水素を測定する手段は、種々の公知の方法により行われる。たとえば、次式のような方法がある。



【003.0】本発明によるHDL-コレステロール測定の典型的な反応タイムコースを図1に示す。本図の横軸は時間、縦軸は、上記のようにペルオキシダーゼを用いる過酸化水素測定の際に生じるキノン色素の、吸収極大波長における吸光度を示す。反応の第1ステップは、血清または血漿から得た試料をリポ蛋白分画剤を含む液

10 *薬はリポ蛋白分画剤を含む試薬とアニオン界面活性剤を含むコレステロール測定試薬の2試薬系からなることが望ましい。本発明のHDL-コレステロールを測定するための試薬は、具体例のひとつとして、第1試薬がリポ蛋白分画剤、緩衝液、コレステロールエステラーゼ、ペルオキシダーゼおよびアニオン界面活性剤を含み、第2試薬がリポ蛋白分画剤、緩衝液、コレステロールオキシダーゼおよびアニオン界面活性剤を含むものがある。4-アミノアンチビリン、フェノール誘導体またはアニリン誘導体は第2試薬に存在させることが好ましい。

【002.3】本発明によるHDL-コレステロール測定は例えば次のようにして行われる。すなわち、まず第1ステップとして、血清または血漿から得た試料をリポ蛋白分画剤を含む液で処理して、HDL-コレステロール以外のリポ蛋白が凝集した混合液の状態とする。この得られた混合液の固体及び液体の分離処理は行わずに、次に第2ステップとして、混合液を、アニオン界面活性剤の存在下で、コレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを含む系とともに恒温保持し、HDL-コレステロールのみを反応させて、生成した過酸化水素を測定することにより、HDL-コレステロールを測定する。

【002.4】本発明を実施する際には、第2ステップにおいては、第1ステップで凝集した固体が再溶解しないように、第1ステップと同濃度のリポ蛋白分画剤を存在させることが望ましい。また、アニオン界面活性剤やコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼなど第2ステップに必要な組成の一部は、第1ステップから存在させても差し支えない。

【002.5】第2ステップにおいてコレステロールより過酸化水素を生成させる手段は、次式の通りである。

【002.6】

【化1】

★【002.9】

★【化3】

50 50 (図1においては試薬1)で処理して、HDL-コレ

テロール以外のリポ蛋白が凝集した混合液の状態であり、図中の吸光度の増大は濁りによるものである。次に第2ステップとして、この濁った液に、アニオン界面活性剤、コレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを含む試薬2を添加すると、濁りが希釈

され一時的に吸光度が下がるが、すぐに試薬とHDL-コレステロールの反応が始まり、吸光度が増大する。このとき、リポ蛋白分画剤の濃度は第1ステップ・第2ステップを通して変わらないように設定されていれば、濁りは消去されることはない。そこで、第1ステップ終了時の吸光度をa、第2ステップ終了時の吸光度をbとすると、その差b-aが、正味のキノン色素の生成、すなわちHDL-コレステロールの量を反映することになる。

【0031】

*10

試薬A

100 mM グッド緩衝液 (PIPES)	pH 7.0
デキストラン硫酸ナトリウム	15 mg/ml
MgCl ₂	200 mM
1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム	50 mg/ml
ペルオキシダーゼ	1 U/ml
コレステロールエステラーゼ	0.5 U/ml
N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-m-アニシジン	0.2 mg/ml

【0033】

20

試薬B

100 mM グッド緩衝液 (PIPES)	pH 7.0
デキストラン硫酸ナトリウム	15 mg/ml
MgCl ₂	200 mM
1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム	50 mg/ml
4-アミノアンチビリン	0.2 mg/ml
コレステロールオキシダーゼ	6 U/ml

【0034】2. サンプル

(財) 化学品検査協会の総コレステロール/HDL-コレステロール標準血清WCHL 941Mを、生理食塩水で希釈して、HDL-コレステロール濃度0 mg/dl～58.4 mg/dlの10段階（0は含まない）の希釈系列を作成した。

【0035】3. 検討方法

上記試薬A 0.26 mlにサンプル 0.003 mlを添加し、37°Cにおいて5分間放置した後、546 nmにおける吸光度を測定した（吸光度a）。ついで、その直※

$$\frac{\text{サンプルの吸光度差} - \text{ブランクの吸光度差}}{\text{標準液の吸光度差} - \text{ブランクの吸光度差}} \times 50 = \frac{\text{HDL-コレステロール}}{(\text{mg/dl})}$$

【0037】測定結果を表1に、サンプル中のHDL-コレステロール値と測定値の関係を図2に示す。

【0038】実施例1の結果より、HDL-コレステロール値が高くなるにつれて吸光度差が比例的に上昇し、試験範囲内において良好な直線性を示していることがわ

*【発明の効果】本発明によれば、前処理なしで直接自動分析機に適用でき、かつ、正確性の高いHDL-コレステロールの測定が可能である。

【0032】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

実施例1 本発明の試薬による測定値の正確性・直線性

1. 試薬

下記組成のものを調製した。

※後に試薬B 0.13 mlを加え、37°Cにおいて5分間放置後の546 nmにおける吸光度を測定した（吸光度b）。ここで（吸光度b-吸光度a）を計算し吸光度差とした。同様に、サンプルのかわりにブランクならびに50 mg/dlの標準液0.003 mlを用いて同様の操作を行って吸光度差を求め、次式でHDL-コレステロール値の計算を行った。

【0036】

【数1】

【表1】

かる。さらに、サンプル中のHDL-コレステロール値と測定値はよく一致し、良好な正確性を示していることがわかる。

【0039】

HDL-コレステロール (mg/dl)	吸光度b-吸光度a (A B S)	測定値 (mg/dl)
0	0.001	—
5.84	0.059	5.82
11.68	0.117	11.70
17.52	0.172	17.54
23.36	0.235	23.34
29.20	0.290	29.21
35.04	0.355	35.02
40.88	0.410	40.89
46.72	0.465	46.70
52.56	0.522	52.59
58.4	0.584	58.41

【0040】実施例2、比較例1

本発明の試薬による測定値と従来の沈澱法による測定値の相関

1. 試薬

a. 本発明の試薬

実施例1の試薬A・試薬Bに同じ。

b. 従来の沈澱法の試薬

分画剤：デキストラン硫酸ナトリウムとMgCl₂、
(コレスカラー・HDL (東洋紡績製) を使用)

コレステロール測定試薬：コレスカラー・リキッド (東洋紡績製)

2. サンプル

血清30検体。

【0041】3. 検討方法

a. 本発明の方法

試薬A 0.26mlにサンプル0.003mlを添加し、37°Cにおいて5分間放置した後、546nmにおける吸光度を測定した(吸光度a)。ついで、その直後に試薬B 0.13mlを加え、37°Cにおいて5分間放置後の546nmにおける吸光度を測定した(吸光度b)。ここで、(吸光度b-吸光度a)を計算し吸光度差とした。同様に、サンプルの代わりにブランクならび

に5.0mg/dlの標準液をそれぞれ0.003ml用いて同様の操作を行って吸光度差を求め、実施例1と同じにして、HDL-コレステロール値の計算を行った。

【0042】b. 従来の沈澱法

分画剤：デキストラン硫酸ナトリウムとMgCl₂、
20 (コレスカラー・HDL (東洋紡績製) を使用) とコレステロール測定試薬：コレスカラー・リキッド(東洋紡績製) を用法・用量に従って使用した。

c. 測定値の相関図と相関式の計算

通常の統計的手法に従って計算した。結果の相関図と相関式を図3に示す。

【0043】実施例2の結果より、本発明の方法(実施例1の方法)と沈澱法の間に良好な相関関係があることがわかる。

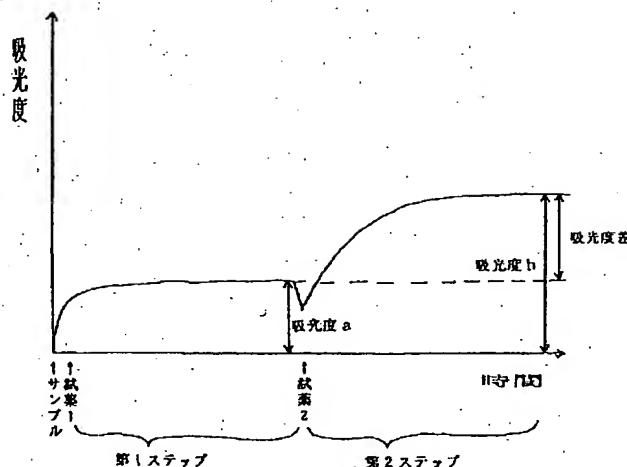
【図面の簡単な説明】

30 【図1】本発明によるHDL-コレステロール測定の典型的な反応タイムコースを示す。

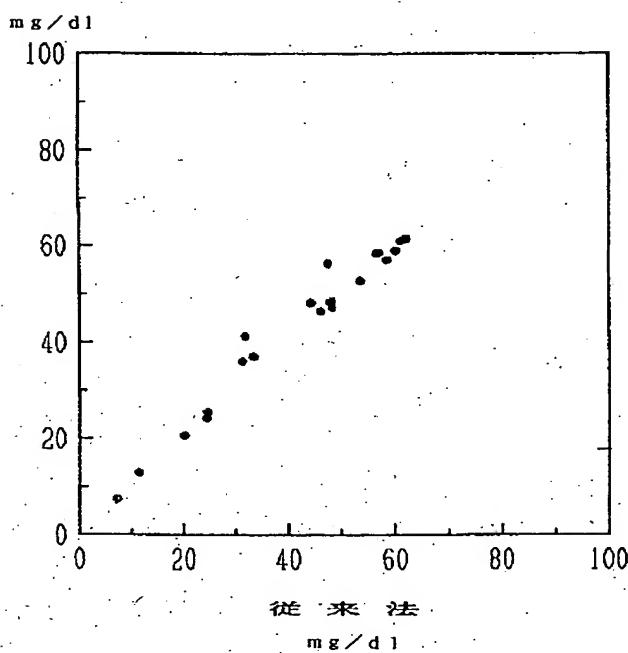
【図2】サンプル中のHDL-コレステロール濃度と本発明の試薬による測定値の関係を示す。

【図3】本発明の試薬による測定値と従来の沈澱法による測定値の相関を示す。

【図1】



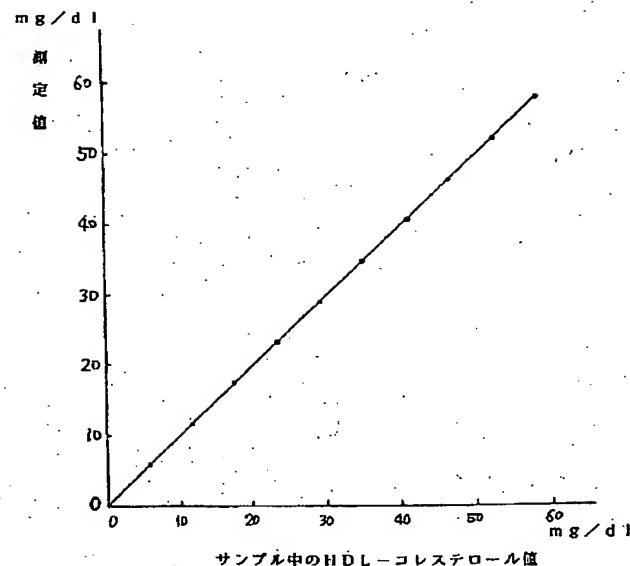
【図3】



$$y = 1.0244x + 0.0237$$

$$r = 0.9907$$

【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 川村 良久

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内